



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

230888

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/42

(22) Prihlásené 10 01 83
(21) (PV 139-83)

(40) Zverejnené 13 01 84

(45) Vydané 15 11 86

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE, MARVANOVÁ LUDMILA RNDr. CSc.,
BRNO, KUNIAK LUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA,

(54) Spôsob produkcie β -mananázy pomocou mikroskopických húb rodu Lemonniera

1

2

Spôsob produkcie β -1,4-manán manánohydrolázy pomocou mikroskopických húb rodu Lemonniera.

Vynález sa týka oboru mikrobiológie, chémie a biochémie sacharidov a ochrany životného prostredia.

Účelom vynálezu je získanie β -1,4-manánu manánohydrolázy [β -mananázy FC 3.2.1.78] schopnej hydrolyticky štepiť β -1,4-manán a β -mananázové zložky hemicelulóz.

Uvedeného účinku sa dosiahne pomocou mikroskopických húb zo skupiny vodných plesní rodu Lemonniera, a to Lemonniera aquatica, Lemonniera centrosphaera, Lemonniera cornuta a Lemonniera terrestris kultivovaných na vhodných živných pôdach.

β -mananázu možno získať o pomerne vysokej špecifickej aktivite (okolo 10 nkat/mg proteínu) a schopnosti štepiť nielen čistý β -1,4-manán ale aj β -manánový podiel hemicelulóz.

Vynález má využitie v technickej mikrobiológii, biochémii sacharidov a všade tam, kde ide o jednoduchú metódu spracovania drevného odpadu.

Vynález sa týka spôsobu produkcie enzýmu β -1,4-manán manánohydrolázy (β -mananáza, EC 3.2.1.78) pomocou mikroskopických húb rodu *Lemonniera* kultivovaných na vhodných živných pôdach.

Produkcia enzýmu β -mananázy je zatiaľ popisovaná zriedkavo, aj keď je známe, že niektoré mikroorganizmy majú schopnosť tento enzým produkovať. Tak napríklad β -mananázová zložka je obsiahnutá aj v komplexnom hemicelulázovom enzýmovom systéme, produkovanom mikroskopickými hubami rodu *Rhizopus* (produkt firmy Sigma), *Aspergillus niger* [Yamazaki, N., Sinner M., Dietrichs H. H.: *Holzforschung* (1976 30, 101)] baktériami *Xanthomonas campestris* [Dekker, R. F. H., Canda, G. P.: *Arch. Microbiol.* (1979 122, 297)], resp. slizovkou *Physarum polycephalum* [Fr. patent 2385 730]].

Schopnosť produkovať tento enzým je však podstatne rozšírenejšia než by zodpovedalo malému počtu publikácií obmedzujúcich sa na niekoľko mikroorganizmov. Pomocou gélovej metódy [A.O. č. 186 059] testovania mikroorganizmov na polysacharid hydrolázy pôsobiace endomechanizmom v priebehu kultivácie zistili sme výraznú produkciu β -mananázovej aktivity u vodných hyfomycet rodu *Lemonniera*.

Rod *Lemonniera* patrí do čelade Moniliaceae rodu Moniliales, triedy Deuteromycetes. Zástupcovia tohto rodu patria medzi vodné hyfomycety.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že kultiváciou nasledovných štyroch kmeňov rodu *Lemonniera*, a to:

<i>Lemonniera aquatica</i>	CCMF — 124
<i>Lemonniera centrosphaera</i>	CCMF — 149
<i>Lemonniera cornuta</i>	CCMF — 325
<i>Lemonniera terrestris</i>	CCMF — 125

jednotlivo alebo ich zmesí na živnej pôde obsahujúcej čistý β -1,4-manán, alebo jeho nerozpustný derivát pripravený v reakcii sieťovania s 2-chlórmetyloxiránom alebo hemicelulózovú zmes polysacharidov obsahujúcich β -1,4-manán pri teplote 15 až 25 °C a pH 5,0 až 6,0, s výhodou pH 5,5 po dobu 96 až 144 hodín produkuje enzým β -mananázu, ktorý sa získa v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v zušľachtenom stave zrážaním síranom amonným alebo organickými rozpúšťadlami, s výhodou etanolu a acetónu.

K ďalšej purifikácii surového enzýmu β -mananázy po dialýze možno použiť afinitnú metódu za použitia sieťovaného manánu (ex *Phytelephas macrocarpe*) ako afinitného ligandu.

Výhodou nového postupu je predovšetkým to, že príprava β -mananázy je veľmi jednoduchá a ako súčasť kultivačnej pôdy možno použiť aj neprečistené natívne substráty typu galaktománov ľahko dostupné ako rôzne druhy poľnohospodárskeho a drevného odpadu. Ďalšou výhodou je pomerne vysoký

výťažok β -mananázovej aktivity, a to aj pri nižších fermentačných teplotách (20 °C). Nakoľko uvedené kmene rodu *Lemonniera* produkujú popri β -mananázovej aktivite aj ďalšie hemicelulázové a celulytické enzýmy, ako aj enzýmy schopné oxidatívne degradovať lignín, možno použiť tieto kmene aj ku komplexnej využitiu drevnej hmoty ovšem v podmienkach optimálnych pre ich rozmnožovanie.

Príklad 1

Lemonniera aquatica CCMF-124, *Lemonniera centrosphaera* CCMF-149, *Lemonniera cornuta* CCMF-325, *Lemonniera terrestris* CCMF-125 sa pomnožia na rastovej pôde obsahujúcej 1,6 gélu (pripraveného sieťovaním β -1,4-manánu rastlinnej slonoviny (*Phytelephas macrocarpe* A. O. č. 186 059) ponoreného do polovice výšky do Yeast Nitrogen Base rastovej pôdy [0,6 g/100 ml]) o pH 5,5 a kultivuje sa na povrchu po dobu 3 dní pri teplote 20 °C, kedy dochádza k stekuteniu gélu. Nahromadená biomasa druhov *Lemonniera* sa použije ako zmesné inokulum pôdy obsahujúcej 20 g kukuričného výluhu, 5 g β -1,4-manánu (pH 6,0) na 1 liter vody a kultivácia prebieha ďalšie 3 dni pri teplote 20 °C. Potom sa biomasa *Lemonniera* odfiltruje a surový enzým β -mananáza sa získa odparením kultivačnej pôdy na vákovej odparke (celková aktivita β -mananázy 52 nkat, o špecifickej aktivite 8,6 nkat/mg proteínu).

Príklad 2

Ako inokulum sa použije kmeň *Lemonniera aquatica* CCMF-124. Na množenie sa použije pôda obsahujúca 1,6 g gélu sieťovaného β -1,4-manánu (A. O. č. 186 059) ponoreného do polovice výšky do Yeast Nitrogen Base rastovej pôdy [0,6 g/100 ml] o pH 5 a kultivuje sa po dobu 2 dní pri teplote 15 °C, kedy dochádza k stekuteniu gélu. Nahromadená biomasa *Lemonniera aquatica* sa použije ako inokulum pôdy obsahujúcej kukuričný extrakt (20 g) a 5 g galaktománu z guaru (*Cyamopsis tetragonoloba* L., Fam. Leguminosae) na 1 liter vody (pH 5,5) a kultivácia prebieha ďalšie 2 dni pri teplote 20 °C. Potom sa biomasa *Lemonniera aquatica* odfiltruje a enzým β -mananáza sa získa v čiastočne zušľachtenom stave zrážaním so síranom amonným (stupeň saturácie 0,65). Celková aktivita β -mananázy 65 nkat o špecifickej aktivite 9,2 nkat/mg proteínu.

Príklad 3

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto *Lemonniera aquatica* sa použije kmeň *Lemonniera terrestris* CCMF-125. Kultivácia prebieha po dobu 3 dní na rastovej pôde s kukuričným výluhom a β -manánom (pH 5,5, teplota 20 °C). Celková

aktivita β -mananázy bola 58 nkat o špecifickej aktivite 10,2 nkat na 1 mg proteinu.

Vynález má použitie v základnom mikrobiologickom a biochemickom výskume a pri produkcii β -mananázy ako jedného z dôle-

žitých enzýmov pri sacharifikácii polysacharidov rôznych drevných odpadov. Vynález možno použiť aj pri úprave vôd obsahujúcich ako odpad extrahovateľnej zložky drevnej hmoty.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob produkcie β -mananázy pomocou mikroskopických húb rodu *Lemonniera*, vyznačený tým, že kultivujú nasledovné kmeňe rodu *Lemonniera*:

<i>Lemonniera aquatica</i>	CCMF — 124
<i>Lemonniera centrosphaera</i>	CCMF — 149
<i>Lemonniera cornuta</i>	CCMF — 325
<i>Lemonniera terrestris</i>	CCMF — 125

jednotlivo, alebo ich zmesi na živnej pôde obsahujúcej β -1,4-manán alebo syntetický derivát β -1,4-manánu pri teplote 15 až 25 °C a pH 5,0 až 6,0 po dobu 120 až 144 hodín a enzým β -mananáza sa získa v surovom stave odparením rastovej pôdy, prípadne v zušľachtilom stave zrážaním síranom amonným alebo organickými rozpúšťadlami, s výhodou etalonom alebo acetónom.